

17. 動物管理室

室長 山田靖子

概要

平成20年度にバイオセーフティレベル3病原体に対応した動物実験施設(ABSL3)が新たに二つ完成した。一つは村山庁舎9号棟内、一つはハンセン病研究センター第2研究棟内である。それぞれ飼育する動物種を想定して、特徴のある施設となっている。ハンセン病研究センターではこれを機に、戸山及び村山庁舎に準じて動物実験施設利用方法の整備を行い、施設利用講習会を開催した。

「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」が平成18年度に施行および策定されたが、これらを受けて財団法人ヒューマンサイエンス財団が、厚生労働省管轄の動物実験施設の外部評価機構として動物実験実施施設認証センターを設立した。感染研は11月に戸山庁舎で実地調査を受け、適合の認定を取得した。認定は庁舎ごととなるため、今回は戸山庁舎のみの認証となっている。

従来、小動物の吸入麻酔にクロロホルム、エーテルが使用されてきたが、従事者の健康被害および引火性の観点からこれらに替わる吸入麻酔薬としてイソフルランが推奨されているため、イソフルラン気化装置を各庁舎に導入した。また、戸山庁舎動物実験管理区では、消毒薬に替わる弱酸性水の生成装置を導入した。

動物管理室は、動物実験施設の管理運営を業務とし、その一環として動物実験施設の定期的微生物検査を行っている。また、昨年度に引き続き、実験動物に関する研究を行なった。実験動物の感染症に関する研究では、マウス肝炎ウイルスの感受性におけるリセプターおよびマスト細胞の役割について、またサルから分離されたアデノウイルスの研究を進めた。モデル動物の開発研究では、麻疹ウイルス病態モデルとしてのカニクイザル、ガングリオシド蓄積症、レオウイルスおよびリフトパレー熱ウイルスの研究を行った。

動物実験管理区は海外および国内から施設見学や研修に対応している。5月中国動物実験施設視察団、6月

及び10月東京大学獣医学科、10月中国、JICA 集団研修、韓国パスツール研、12月アジアバイオセーフティ地域研修会、国内医師卒後研修、3月中国 CDC に対応した。

平成20年4月に研究員として酒井宏治を迎えた。また、昨年度定年退官した須崎百合子が短時間再任用職員として業務の一旦を担っている。

講習会開催及び動物管理区の利用状況

動物管理室は動物実験委員会の事務局を担当し、講習会を開催している。平成18年度に動物実験に関わる感染研内の各種規程を改正したが、改正後の講習会を受講した人数は621名となり、平成20年度に申請された動物実験計画は280件であった。

動物実験委員会の講習会とは別途に、各庁舎ではそれぞれの動物実験施設の利用方法および実験動物の飼養・保管に関する講習会を行い、受講者を施設利用者として登録している。各施設の利用登録者数は平成21年3月31日現在、戸山庁舎329人、村山庁舎181人、ハンセン病研究センター16人である。

実験動物施設利用者講習会および動物実験講習会 実績

開催月 日	開催 場所	受講者数			
		施設利用 (戸山)	施設利用 (村山)	施設利用 (ハン セン)	動物 実験 (全所)
4月7日	戸山	23			33
5月27日	村山		9		
6月4日	戸山	11			14
6月11日	戸山				1
8月5日	戸山	9			11
10月1日	戸山	5			8
12月2日	戸山	5			11
1月14日	村山		9		
2月4日	戸山	6			9
2月20日	ハン セン			10	

3月4日	ハン セン			6	
合計		59 新規	18 新規	16 本年度 より実施	87 年度内 受講者数

(斜字は外国人対照講習会)

業 績

調査・研究

I 動物実験施設の微生物モニタリング

I-1 定期検査

戸山、村山両庁舎の各飼育室にモニター動物を配置し、月一回定期的に微生物モニタリングを行っている。結果は別表1に示す。緑膿菌、黄色ブドウ球菌に陽性が散見されたが、これらはいわゆる日和見病原体で免疫機能が正常な動物には病原性はない。それ以外の病原体については全て陰性であり、飼育室は清浄に保たれている。

(網 康至、須崎百合子、滝本一広、田原口元子、平井明香、酒井宏治、小川敏雄、山田靖子)

II 実験動物の感染症に関する研究

II-1 異なる受容体を持つマウスのマウス肝炎ウイルス感受性に関する研究

マウス肝炎ウイルス(MHV)は CEACAM1 を受容体として利用し、感受性 C57BL/6 (B6/1a)マウスは CEACAM1a (1a)を、抵抗性 SJL マウスは CEACAM1b (1b)を発現している。両系統の MHV 感受性が受容体に依存するかを検討するため、B6/1a マウスの 1a 遺伝子を 1b に置換した遺伝子改変マウス B6/1b を作製し、これは SJL より高度な MHV 抵抗性を示した。本年度は B6/1b マウス組織および細胞での 1b 発現、および MHV 感染時の病理像を解析した。B6/1b の腸および肝組織での 1b 発現は B6/1a の 1a および SJL の 1b と同様な局在であること、また腹腔マクロファージ (PM) 表面に 1b が発現していることが確認された。PM の MHV 感受性は B6/1a>SJL>B6/1b の順でありマウス生体の MHV 感受性と一致した。肝の炎症・壊死の程度およびウイルス抗原量は B6/1a>SJL>B6/1b の順であった。今回の実験結果から病理組織学的にも B6/1b と SJL で MHV 感受性に差が認められ、両者は組織および細胞表面に同様に 1b を発現していることから、MHV 感受性差は CEACAM1 の受容体活性だけでは説明できず、本遺伝子以外にも

MHV 感受性に関与する遺伝子が存在する可能性が示唆された。[平井明香、網康至、山田靖子、田口文広 (ウイルス3部)]

II-2 マウス肝炎ウイルス感染におけるマスト細胞の役割の解明

遺伝的にマスト細胞を欠損する WBB6F1-W/W^V マウスに、そのコントロール+/+マウスおよび TLR3 を欠損したマウスから得た骨髄培養マスト細胞を摂取してマスト細胞を修復させた W/W^V マウスに MHV を感染させ生存率を比較した。その結果、MHV 感染によって生存率に差は認められなかった。修復 W/W^V マウスの抗体価は、接種後 6 日以内に死亡したマウスでは上がっていなかったが、11 日および 12 日に発症したマウスや生存した 3 週間のマウスでは上昇していた。臓器内のウイルス力価は、+/+マスト細胞修復 W/W^V マウスの肝臓では接種後 4 日、脳で 4 と 11 日、TLR3 マスト細胞修復 W/W^V マウスの肝臓では接種後 4 と 11 日、脳で 3、6 日および 12 日にウイルス力価の上昇が認められた。

(田原口元子、山田靖子)

II-3 水様性下痢を呈したカニクイザルから分離したアデノウイルスの分子系統学的解析

重度の食欲減退・水様性下痢等を呈したカニクイザルの剖検材料を Vero E6 細胞接種した結果、胃・空腸・回腸・盲腸・結腸の乳剤および直腸拭い液からウイルスが分離された。盲腸乳剤及び直腸拭い液の感染細胞培養上清の電子顕微鏡による鏡検からは、アデノウイルス様粒子が認められた。また、全ての分離ウイルスが PCR によりアデノウイルスと同定された。サル臓器の病理組織学解析でも結腸上皮細胞核内にアデノウイルス様粒子が確認された。分離ウイルスの pTP、52K、pIIIa、penton base (III) 遺伝子の配列を既知のアデノウイルスと比較した結果、Species A~F の系統には分類されず、1956 年にカニクイザル臓器から分離されたサルアデノウイルス-1 や 2007 年にヒト下痢患者から分離された新しい血清型のヒトアデノウイルス-52 と比較的近縁であった。

[酒井宏治、永田典代¹、岩田奈織子¹、長谷川秀樹¹、松井珠乃²、網康至、平井明香、須崎百合子、水谷哲也³、福士秀悦³、緒方もも子³、西條政幸³、藤本嗣人、山田靖子、岡部信彦²、佐多徹太郎¹、倉根一郎³、森川茂³ (動物管理室、¹感染病理部、²感染症情報センター、³ウイルス第一部)]

III モデル動物の開発

III-1 麻疹ウイルス感染症モデル動物の開発と病態解析

麻疹ウイルスの脳内侵入経路を明らかにする目的で、感染自己単核細胞を視床に接種したカニクイザル2頭について、脳内における麻疹ウイルスの持続感染について検討を行っている。血中においてウイルス中和抗体価が持続的に高値を示し、かつ、脳脊髄液中に中和抗体が認められ持続感染が疑われる個体では、脳液において、前頭および頭頂部に周期性の徐波が認められ、経過を観察中である。(網 康至、須崎百合子)

III-2 MCC 系マストミス腎臓におけるガングリオシド蓄積症

MCC マストミス腎における GM2 および Fuc-GM1 の蓄積の原因の一つとして、*N*-acetylgalactosaminyltransferase (GM2 合成酵素) 活性の増加について検討した。UDP-*N*-acetyl-D-[6-³H]galactosamine を基質として、MCC (5 ヶ月齢) の腎における *N*-acetylgalactosaminyltransferase 活性を測定し、正常マストミス (MWC) と比較したが、系統間で差はほとんど認められず、本酵素は GM2 および Fuc-GM1 の蓄積に関与していないことが示唆された。(滝本一広)

III-3 急性呼吸器患者からの分離された新型レオウイルスに関する研究

1) 新型レオウイルスの S セグメントの遺伝子配列決定及び系統学的解析

2007 年にインドネシアから帰国後、高熱と急性の呼吸器症状を伴い入院した患者咽頭拭い液からオルソレオウイルス属の Melaka ウイルスと類似のウイルス (以下、宮崎株) を分離した。これらのウイルスが属するネルソンベイオルソレオウイルス (Nelson) グループで保存されているプライマーを用いた RT-PCR 産物の塩基配列を決定し、分子系統学的解析を実施した。宮崎株の S2、S3、S4 セグメントの塩基配列は、2007 年に急性呼吸器感染症患者から分離された HK23629/07 株と 99% 一致した。一方、S1 セグメントの塩基配列は両者で 67% と低い一致率で、特に S1 セグメントのコードする 3 つのタンパク質のうち sigmaC においてアミノ酸相同性が 56% と低かった。この結果は、Nelson グループのウイルス間での sigmaC のアミノ酸配列の保存性が低いことと一致する。以上の結果から、宮崎株は HK23629/07 株と共に Nelson グループに分類される新たなウイルスであることが明らかとなった。

2) 新型レオウイルスのマウスでの病原性の解析

急性呼吸器感染症患者から分離された新型レオウイルス

宮崎株の病原性の解明および動物発症モデル開発のため、9 週齢 BALB/c マウスへの感染実験を実施した。10⁶ 及び 10⁵ PFU 経鼻接種群では、感染翌日には典型的な呼吸器症状を呈し、著しい体重減少を伴いながら感染 6 日後までにそれぞれ 100% 及び 67% の致死率を示した。病理所見では、肺のうっ血・水腫を伴う広範囲の肺炎様病変が認められ、気管及び肺から高力価のウイルスが分離された。以上より、宮崎株が BALB/c マウスにおいて実験的に急性呼吸器症状を示すことを明らかにし、当該ウイルスの発症モデルが開発された。

[酒井宏治、網康至、平井明香、山田靖子 (動物管理室)、福士秀悦、水谷哲也、西條政幸、緒方もも子、倉根一郎、森川茂 (ウイルス第一部)]

III-4 リフトバレー熱ウイルス L 蛋白に関する研究

リフトバレー熱ウイルス (RVFV) の L 蛋白 (L) は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ活性を有し、ウイルス増殖に必須の蛋白である。近年、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルスやセンドライウイルスなどの L 蛋白が多量体として機能する事が報告されている。本研究では、RVFV-L の複合体形成の有無と機能的な重要性を調べるために、ミニゲノムアッセイを用いた機能的なタグ付加 L 蛋白発現の検討、及び、タグ付加 L 蛋白を用いた免疫沈降を行った。その結果、N 末端タグ付加 L 蛋白が機能的であること、また、細胞内で L 蛋白が多量体を形成することが明らかとなった。不活性型 L 蛋白は活性型 L 蛋白複合体のポリメラーゼ機能を阻害したことから、複合体形成が機能に重要であることが示唆された。[新倉綾、池上徹郎¹、C.J.Peters¹、牧野伸治¹ (¹テキサス大学医学部)]

発表業績一覧

I 誌上発表

I-1 欧文発表

- 1) Takimoto K., Taharaguchi M., Morikawa S., Ike F., and Yamada Y.K. : Detection of the antibody to lymphocytic choriomeningitis virus in sera of laboratory rodents infected with viruses of laboratory and newly isolated strains by ELISA using purified recombinant nucleoprotein. *Experimental Animals*, 57: 357-365 (2008)
- 2) Sakai K., Ueno Y., Ueda S., Yada K., Fukushi S., Saijo M., Kurane I., Mutoh K., Yoshioka K., Nakamura M., Takehara K., Morikawa S., Mizutani T. : Novel reovirus isolation from an Ostrich (*Struthio camelus*) in Japan. *Veterinary*

Microbiology. 134: 227–32 (2009)

- 3) Li TC, Suzaki Y, Ami Y, Tsunemitsu H, Miyamura T, Takeda N. : Mice are not susceptible to hepatitis E virus infection. *J Vet Med Sci.*70:1359-62 (2008)
- 4) Watanabe S., Mizutani T., Sakai K., Kato K., Tohya Y., Fukushi S., Saijo M., Yoshikawa Y., Kurane I., Morikawa S., Akashi H. : Ligation-mediated amplification for effective rapid determination of viral RNA sequences (RDV). *Journal of Clinical Virology.* 43: 56-9 (2008)
- 5) Iizuka I., Saijo M., Shiota T., Ami Y., Suzaki Y., Nagata N., Hasegawa H., Sakai K., Fukushi S., Mizutani T., Ogata M., Nakauchi M., Kurane I., Mizuguchi M., Morikawa S. : Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *Journal of Medical Virology* 81: 1102-8 (2009)
- 6) Yamao T., Eshita Y., Kihara Y., Satho T., Kuroda M., Sekizuka T., Nishimura M., Sakai K., Watanabe S., Akashi H., Rongsriyam Y., Komalamisra N., Srisawat R., Miyata T., Sakata A, Hosokawa M., Nakashima M., Kashige N., Miake F., Fukushi S., Nakauchi M., Saijo M., Kurane I., Morikawa S., Mizutani T. : Novel virus discovery in field-collected mosquito larvae using an improved system for rapid determination of viral RNA sequences (RDV ver4.0). *Archives of virology* 154: 153-8 (2009)
- 7) Saijo M., Ami Y., Suzaki Y., Nagata N., Iwata N., Hasegawa H., Iizuka I., Shiota T., Sakai K., Ogata M., Fukushi S., Mizutani T., Sata T., Kurata T., Kurane I., Morikawa S. : Virulence and pathophysiology of the Congo Basin and West African strains of monkeypox virus in nonhuman primates. *The Journal of general virology* (in press)

II 学会発表

II-1 国際学会

- 1) Hirai A, Ohtsuka N, Ikeda T, Taniguchi R, Nakagaki K, Suzuki H, Yasushi A, Yamada YK, Itohara S & Taguchi F. Involvement of MHV receptor and other factors in the resistance to MHV as revealed by receptor gene-replaced mice. XIth International Nidovirus Symposium. Jun 2008, Oxford, UK.
- 2) Fukushi S, Hirai A, Niikura A, Maeda K, Yoshikawa Y, Yamada YK, Yokoyama M, Mizutani T, Sakai K, Saijo M, Kurane I & Morikawa S. Functional characterization of bat

angiotensin-converting enzyme 2 protein in SARS coronavirus Infection. XIth International Nidovirus Symposium. Jun 2008, Oxford, UK.

- 3) Ike, F., Sakai, K., Mizutani, T., Takimoto, K., Bourgade, F., Jaubert, J., Montagnetelli, X., Kajita, A., Nakata, H., Yoshiki, A., Morikawa, S. : Further analysis of LCMV M1 isolate. AALAS National Meeting. Nov 2008, Indianapolis, USA.

II -2 国内学会

- 1) 酒井宏治、水谷哲也、福士秀悦、西條政幸、上野勇一、上田修平、平井明香、網康至、岡村雅史、中村政幸、竹原一明、山田靖子、倉根一郎、森川茂：網羅的ウイルスゲノム検出方法を用いたダチョウレオウイルスの同定。第146回日本獣医学会学術集会、平成20年9月、宮崎。
- 2) 酒井宏治、網康至、水谷哲也、岩切章、山本正悟、平井明香、須崎百合子、滝本一広、田原口元子、飯塚愛恵、福士秀悦、西條政幸、永田典代、片山紀代、長谷川秀樹、山田靖子、倉根一郎、森川茂：急性呼吸器患者から分離された新型レオウイルスの性状解析及びマウスでの感染実験。第56回日本ウイルス学会学術集会、平成20年10月、岡山。
- 3) 平井明香、大塚信久、池田敏男、谷口理絵、中垣慶子、鈴木秀佳、網康至、山田靖子、糸原重美、田口文広：マウス系統間におけるマウス肝炎ウイルス感受性差に関する解析。第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
- 4) 山田靖子：人獣共通感染症の動物実験における適正な管理。第55回日本実験動物学会総会、平成20年5月、仙台。
- 5) 山田靖子：感染実験における適正な動物実験の実施に向けて。第82回日本細菌学会総会、平成21年3月、名古屋。
- 6) 白戸憲也、前島 円、平井明香、松山州徳、網康至、川瀬みゆき、田口文広：Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) のマウス馴化株の分離と性状解析。第56回日本ウイルス学会、平成20年10月、岡山。
- 7) 渡辺俊平、水谷哲也、酒井宏治、福士秀悦、緒方もも子、遠矢幸伸、吉川泰弘、森川茂、倉根一朗、明石博臣：網羅的ウイルスゲノム検出法 (RDV 法) の改良。第56回日本ウイルス学会学術集会、平成20年10月、岡山。
- 8) 西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、長谷川秀樹、飯塚愛恵、塩田智之、緒方もも子、酒井宏治、中

内美名、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎、森川茂：劇症型サル痘に関する解析：症状、ウイルス学的検査所見、病理。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月、岡山。

- 9) 飯塚愛恵、西條政幸、網康至、須崎百合子、永田典代、長谷川秀樹、緒方もも子、酒井宏治、塩田智之、中内美名、福士秀悦、水谷哲也、倉根一郎、森川茂：Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法によるサル痘迅速診断。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月、岡山。
- 10) 福士秀悦、中内美名、酒井宏治、西條政幸、水谷哲也、緒方もも子、倉根一郎、森川茂：リフトバレー熱ウイルスの NP に対する単クローン抗体の作製と抗原検出 ELISA 法への応用。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月、岡山。
- 11) 中内美名、福士秀悦、酒井宏治、水谷哲也、緒方もも子、倉根一郎、西條政幸、Victor Romanowski、森川茂：南米出血熱の実験室診断法の開発。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月、岡山。
- 12) 大黒恵理子、水谷哲也、酒井宏治、高崎智彦、中村昇太、中屋隆明：ヒト胃癌由来培養細胞に持続感染しているウイルスの同定。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月、岡山。
- 13) 水谷哲也、山尾卓也、江下優樹、片野晴隆、黒田誠、関塚剛史、渡辺俊平、明石博臣、竹原一明、木原悠希、佐藤朝光、西村美保、酒井宏治、福士秀悦、西條政幸、緒方もも子、中内美名、倉根一郎、森川茂：ウイルスの網羅的検出法 (RDV 法) と次世代シーケンサーによる新しいウイルスの発見。第 56 回日本ウイルス学会学術集会、平成 20 年 10 月、岡山。
- 14) 水谷哲也、山尾卓也、江下優樹、木原悠希、佐藤朝光、黒田誠、関塚剛史、西村美保、酒井宏治、福士秀悦、緒方もも子、中内美名、倉根一郎、森川茂：ウイルスの網羅的方法の改良と新しいブニヤウイルスの発見。第 146 回日本獣医学会学術集会、平成 20 年 9 月、宮崎。

動物管理室

(別表1)

定期的微生物モニタリング成績

病原体検査項目		検査方法	年間検査結果 (陽性数/検査数)					
			戸山庁舎			村山分室		
			マウス	ウサギ	モルモット	マウス	ウサギ	モルモット
サルモネラ	Salmonella spp.	培養	0/240	0/2	0/4	0/192	0/72	0/95
ティザー菌	Clostridium piliforme	血清反応	0/240	0/2	0/4	0/192	0/72	0/95
緑膿菌	Pseudomonas aeruginosa	培養	0/240	0/2	0/4	87/192	0/72	0/95
黄色ブドウ球菌	Staphylococcus aureus	培養	24/240	0/11	3/22	44/192	0/72	61/95
腸粘膜肥厚菌	Citrobacter rodentium	培養	0/240			0/192		
肺バクテリヤ	Pasteurella pneumotropica	培養	0/240			0/192		
ネズミコリネ菌	Corynebacterium kutscheri	培養	0/240			0/192		
肺マイコプラズマ	Mycoplasma pulmonis	培養・血清反応	0/240			0/192		
ウサギバクテリヤ	Pasteurella multocida	培養		0/11			0/72	
気管支敗血症菌	Bordetella bronchiseptica	培養		0/11	0/22		0/72	0/95
溶血連鎖球菌	Streptococcus zooepidemicus	培養			0/22			0/95
肺炎球菌	Streptococcus pneumoniae	培養			0/22			0/95
センダイウイルス	Sendai virus (HVJ)	血清反応	0/240	0/2	0/4	0/192	0/72	0/95
マウス肝炎ウイルス	Mouse hepatitis virus(MHV)	血清反応	0/240			0/192		
エクトメリア	Ectromelia virus	血清反応	0/88			0/80		
リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス	Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	血清反応	0/88			0/80		
ジアルジア	Giardia muris	鏡検	0/240					
スピロスクレウス (ヘキサミタ)	Spironucleus muris (Hexamita muris)	鏡検	0/240					
ネズミ盲腸蟻虫	Syphacia spp.	鏡検	0/240					
ネズミ大腸蟻虫	Aspicularis tetraptera	鏡検	0/240					
囊尾虫	Cysticercus fasciolaris	剖検・肉眼所見	0/240					
ネズミケモチダニ	Myobia musculi	鏡検	0/240					
ラドフォルジア	Radfordia affinis	鏡検	0/240					
コクシジウム	Eimeria caviae, Eimeria spp.	鏡検		0/2	0/4			
囊尾虫	Cysticercus pisiformis	剖検・肉眼所見		0/2				
ウサギ疥癬ダニ	Psoroptes cuniculi	鏡検		0/2				

(空欄は検査を実施していない)